

**PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE N-BENZYL-3-PYRROLIDINOL**

Patent Number: JP6141876  
Publication date: 1994-05-24  
Inventor(s): MOCHIDA KENICHI; others: 01  
Applicant(s): KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD  
Requested Patent: ☒ JP6141876  
Application Number: JP19920299780 19921110  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P17/10  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To provide method for producing optically active N-benzyl-3- pyrrolidinol which is an important intermediate for optically active compounds useful as a medicine.

**CONSTITUTION:** This method for producing optically active N-benzyl-3- pyrrolidinol is characterized by stereoselectively reducing N-benzyl-3- pyrrolidinone in the presence of an enzymic source having the activity of stereoselectively reducing the compound.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141876

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/10		C 8931-4B		
// (C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:02)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:15)				

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-299780

(22)出願日 平成4年(1992)11月10日

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 持田 顕一

神奈川県平塚市真田325-5

(72)発明者 藤元 友子

東京都町田市中町3-9-10

(54)【発明の名称】 光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法

(57)【要約】

【目的】 医薬品として有用な光学活性化合物の重要中間体である光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法を提供する。

【構成】 N-ベンジル-3-ピロリジノンを該化合物を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、立体選択的に還元することを特徴とする光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-ベンジル-3-ピロリジノンを経化合物を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、立体選択的に還元することを特徴とする光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法。

【請求項2】 酵素源がアセトバクター属、コリネバクテリウム属、グルコバクター属、シュードモナス属、バチラス属、エシェリヒア属、ブレヴィバクテリウム属、アスペルギルス属、シエラビア属、サッカロマイコブシス属、サッカロマイセス属、パチソレン属、ロドトルラ属、キャンディダ属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属、アクチノブレインズ属、アミコラタ属、キタサトスポリア属、シトロバクター属、アミコラトブシス属、ヒブリオ属、フェロマイセス属、ノカルディオブシス属に属し、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する微生物の菌体、培養物またはそれらの処理物である請求項1記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質やジドロピリジン系化合物など医薬品として有用な光学活性化合物の重要中間体である光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、光学活性な3-ピロリジノール誘導体の製造法としては、大別して(1)キラルな化合物を出発物質として合成する方法および(2)プロキラルな化合物を出発物質として、不斉合成あるいは分割によって光学活性体を合成する方法の2つの方法が知られている。

【0003】(1)に関しては、ヒドロキシプロリンより合成する方法(特開昭60-23328号公報)、D-リンゴ酸から合成する方法〔ヘテロサイクルズ(Heterocycles), 24, 1331(1986)〕、グルタミン酸から合成する方法〔シンセティック・コミュニケーションズ(Synth. Commun.), 16, 1815(1986)〕、アスパラギン酸から合成する方法〔ヘテロサイクルズ(Heterocycles), 24, 1331(1986)〕、グルタミンから合成する方法〔プレティン・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャパン(Bull. Chem. Soc. Jpn.), 51, 3296(1978)〕などが知られている。

【0004】(2)に関しては、4-ヒドロキシ-2-ピロリドンから合成する方法(特開平1-207266号公報)、アミノブタノール誘導体から合成する方法(特開平3-176462号公報)、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンニトリルのスルホン酸エステルから合成する方法(特開平3-176463号公報)などが知られている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの新規な製造

法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、N-ベンジル-3-ピロリジノンを該化合物を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、立体選択的に還元することを特徴とする光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールの製造法を提供することができる。以下、本発明を詳細に説明する。本発明の還元反応に用いられる酵素源としては、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する微生物の菌体、培養物またはそれらの処理物であればいずれでも用いることができる。

【0007】このような活性を有する微生物としては、例えば、アセトバクター(Acetobacter)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、グルコバクター(Gluconobacter)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、バチラス(Bacillus)属、エシェリヒア(Escherichia)属、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、シエラビア(Thielavia)属、サッカロマイコブシス(Saccharomycopsis)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、パチソレン(Pachysolen)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、キャンディダ(Candida)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、アクチノブレインズ(Actinoplanes)属、アミコラタ(Amycolata)属、キタサトスポリア(Kitasatosporia)属、シトロバクター(Citrobacter)属、アミコラトブシス(Amycolatopsis)属、ヒブリオ(Vibrio)属、フェロマイセス(Fellomyces)属、ノカルディオブシス(Nocardioopsis)属などに属する微生物があげられる。このような微生物は一般に、入手または購入が容易である保存株から得ることができる。また、自然界から分離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせて生産性の高い菌株を得ることもできる。

【0008】前記微生物の培養により得られる菌体の処理物としては、菌体の乾燥物、界面活性剤または有機溶剤添加物、溶菌酵素処理物、固定化菌体あるいは菌体からの抽出酵素標品などがあげられる。また、培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤または有機溶剤添加物、溶菌酵素処理物などがあげられる。さらに、培養菌体、培養物より酵素を精製し、これを使用してもよい。

【0009】本発明に用いる微生物の培養は、通常、振盪培養あるいは通気攪拌深部培養などの好気的条件下で行う。培地としては、使用菌株が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩および微量有機栄養源を程良く含有するものならば、合成培地または天然培地いずれも用いることができる。

【0010】炭素源としては、グルコース、マルトース、デンプン加水分解物、糖蜜などの炭水化物が使用できる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウ

ム、塩化アンモニウムなどの各種の無機および有機のアンモニウム塩類、または、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、ペプトン、ポリペプトン、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物などの窒素含有有機物などが使用できる。

【0011】無機塩としては、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化亜鉛、塩化カリウム、塩化コバルトなどが使用できる。他に微量元素としてモリブデン、タングステン、ストロンチウムなどの塩類を加えてもよい。培養温度は20～37℃、培養pHは6～9で、1～14日間培養する。

【0012】本発明の基質となるN-ベンジル-3-ピロリジノンは特開昭54-16466号公報に記載の方法に準じて合成することができる。本発明のN-ベンジル-3-ピロリジノンの立体選択的な還元は、水性媒体中、前記微生物の菌体、培養物もしくはそれらの処理物とN-ベンジル-3-ピロリジノンを混合し、攪拌または振盪することにより行われる。

【0013】水性媒体としては、水または水とエタノール、アセトン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミドなどの混合溶媒が用いられる。基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンは、反応液に対して0.1～50重量%用いられ、微生物菌体処理物等は基質に対して1～500重量%用いられる。このとき、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンの分散性を向上させるためにノニオン（日本油脂製）、スパン（関東化学社製）、トリトン（半井化学社製）などの界面活性剤を添加することもできる。さらに、反応液のpHを一定に保つために、磷酸ナトリウム、磷酸カリウムなどの無機酸塩の緩衝液または酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどの有機酸塩の緩衝液などを用いることもできる。また必要に応じて、水酸化ナトリウムなどの塩基を添加することもできる。

【0014】反応は温度0～70℃、好ましくは20～50℃、pH4～9の条件で行われる。反応時間は用いる基質濃度、微生物菌体量、反応温度などによって異なるが、通常1～100時間で終了する。反応液から目的物を単離精製するには、微生物菌体などを除去した後、溶媒抽出、洗浄、濃縮、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどによって行うことができる。

【0015】このようにして得られるN-ベンジル-3

-ピロリジノールは、(5R, 6S)-2-[(S)-1-(アセトイミドイル)ピロリジン-3-イルチオ]-6-[(R)-1-ヒドロキシエチル]カルバベン-2-エム-3-カルボン酸（特開昭60-19764号公報）などのβ-ラクタム系抗生物質や、(3S)-1-ベンジル-3-ピロリジニルメチル(4S)-2, 6-ジメチル-4-(m-ニトロフェニル)-1, 4-ジヒドロピロリジン-3, 5-ジカルボキシレート〔化合物(1)；ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.), 29, 2504(1986)〕などのジヒドロピロリジン系化合物の合成中間体として有用である。例えば、化合物(1)は、光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールからジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー, 29, 2504(1986)に記載の方法に従い製造することができる。

【0016】以下の実施例により本発明の態様を説明する。

【0017】

【実施例】

#### 20 実施例1

ペプトン2%、肉エキス0.7%、酵母エキス0.5%、食塩0.3%（pH7.2）の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、第1表に示す菌株を各々植菌し、28℃で24時間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離（10,000rpm, 5分間）し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7）3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mgを含む0.06mlのエタノールを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールの転換率、光学純度を測定した。HPLCの条件は以下の通りである。

【0018】HPLC カラム キラルセルOD（ダイセル社製）、溶出溶媒 ヘキサン：イソプロパノール：ジエチルアミン＝95：5：0.1、流速 1ml/分、検出 UV254nm吸収  
結果を第1表に示す。

#### 40 【0019】

【表1】

第 1 表

菌株名	光学純度 (%ee) (立体配置)	転換率 (%)
<u>Acetobacter aceti</u> IFO 3288	4.7(S)	54.2
<u>Corynebacterium liquefaciens</u> ATCC 14929	100 (S)	100
<u>Gluconobacter nonoxygluconicus</u> IFO 3275	55.7(S)	55.5
<u>Pseudomonas putida</u> ATCC 795	10.7(S)	64.3
<u>Pseudomonas gladioli</u> ATCC 19302	66.2(S)	63.9
<u>Bacillus</u> sp. ATCC 21615	74.4(S)	100
<u>Escherichia coli</u> ATCC33525	31.4(S)	77.2
<u>Corynebacterium glutamicum</u> ATCC 13032	61.7(S)	100
<u>Brevibacterium</u> sp. ATCC 14902	100 (S)	80.0

## 【0020】実施例2

麦芽エキス2%、グルコース2%、ペプトン0.1%  
(pH6)の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、第2表に示す菌株を各々植菌し、28℃で4日間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離(10,000rpm,5分間)し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7)3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mg\*

第 2 表

菌株名	光学純度 (%ee) (立体配置)	転換率 (%)
<u>Aspergillus sydowi</u> IFO 4284	98 (R)	37.2
<u>Thielavia terrestris</u> ATCC 24302	49.0(S)	41.2

## 【0022】実施例3

ペプトン2%、肉エキス0.7%、酵母エキス0.5%、食塩0.3%(pH7.2)の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、Acetobacter aceti IFO 3288を植菌し、28℃で24時間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離(10,000rpm,5分間)し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7)3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mgを含む0.06mlのエタノールと27mgのグルコースを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLCにて生成したN-ベンジル-3-ピロリジ

ノールを含む0.06mlのエタノールを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLCにて生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールの転換率、光学純度を測定した。なお、HPLCの条件は実施例1と同様である。結果を第2表に示す。

【0021】

【表2】

ノールの転換率、光学純度を測定したところ、転換率>95%、光学純度60%eeで(R)異性体を得た。なお、HPLCの条件は実施例1と同様である。

## 【0023】実施例4

グルコース1%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%(pH6)の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、第3表に示す菌株を各々植菌し、28℃で24時間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離(10,000rpm,5分間)し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7)3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mgを含む0.06mlのエタ

ノールを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLCにて生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールの転換率、光学純度を測定した。なお、HPLCの条件は実施例1と同様\*

\*である。結果を第3表に示す。

【0024】

【表3】

第3表

菌株名	光学純度 (%ee) (立体配置)	転換率 (%)
<u>Saccharomycopsis lipolytica</u> IFO 0746	54.7(S)	100
<u>Saccharomyces kloetzerianus</u> IFO 0016	17.4(S)	86.3
<u>Pachysolen tannophilus</u> IFO 1007	0.9(R)	52.6
<u>Rhodotorula rubra</u> ATCC 20258	73.5(S)	100
<u>Candida oleophila</u> ATCC 20177	100 (S)	100

【0025】実施例5

ダイズポテト30%、グルコース2% (pH6) の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、Aspergillus sydowi IFO 4284 を植菌し、28℃で8日間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離 (10,000rpm, 5分間) し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) 3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mgを含む0.06mlのエタノールを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLCにて生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールの転換率、光学純度を測定したところ、転換率>95%、光学純度>95% ee で (R) 異性体を得た。なお、HPLCの条件は実施例1と同様である。

※ グルコース1%、ペプトン2%、肉エキス0.7%、酵母エキス0.5%、食塩0.3% (pH7.2) の組成から成る培地30mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、滅菌後、第4表に示す菌株を各々植菌し、28℃で2日間振盪培養を行った。培養終了後、培養物を遠心分離 (10,000rpm, 5分間) し、菌体を集め生理食塩水で洗浄した。この菌体をトリトンX100を0.5%含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) 3mlに懸濁し、N-ベンジル-3-ピロリジノン12mgを含む0.06mlのエタノールを加え、30℃にて24時間振盪した。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、HPLCにて生成したN-ベンジル-3-ピロリジノールの転換率、光学純度を測定した。なお、HPLCの条件は実施例1と同様である。結果を第4表に示す。

【0027】

【表4】

【0026】実施例6

※

第4表

菌株名	光学純度 (%ee) (立体配置)	転換率 (%)
<u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 10143	64.2(S)	100
<u>Rhodococcus rhodochrous</u> ATCC 21198	100 (S)	93.4
<u>Rhodococcus rhodochrous</u> ATCC 21199	100 (S)	100
<u>Actinoplanes deccanensis</u> ATCC 21983	46.3(S)	55.5

【0028】

【発明の効果】本発明によれば、β-ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物など医薬品として有用な

光学活性化合物の重要中間体である光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノールを高収率で製造することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:07)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:185)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:66)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:85)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:72)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:32)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:63)				
(C 1 2 P 17/10				
C 1 2 R 1:365)				